

**ОЧИСТКА ФЕРМЕНТОВ, ОБЛАДАЮЩИХ  
МОЛОКОСВЕРТЫВАЮЩЕЙ АКТИВНОСТЬЮ  
ИЗ КУЛЬТУРАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ ВЕШЕНКИ  
ОБЫКНОВЕННОЙ (*PLEUROTUS OSTREATUS*)**

*Сакович Валерия Васильевна, м.б.н., ассистент*

*Буснюк Екатерина Васильевна, магистрант*

*Жерносеков Дмитрий Данилович, к.б.н., доцент*

*Полесский государственный университет*

Протеолитические ферменты широко используются в сыроделии. Однако крупномасштабное производство сычужных ферментов из животного сырья имеет трудности из-за ограниченной сырьевой базы, что приводит к поиску альтернативных источников получения протеолитических энзимов [1, с.1849]. Одним из перспективных альтернативных источников получения протеолитических ферментов являются базидиальные грибы, среди которых имеются активные продуценты молокосвертывающих протеиназ [2, с.110]. В литературе имеются данные, что экстракт плодовых тел *P. ostreatus* имеет сходство с препаратами, используемыми в молочной промышленности, и после проведения очистки может быть применен в сыроделии [3, с.849].

Целью данной работы является хроматографическая очистка ферментного препарата из культуральной жидкости *P. ostreatus*.

Для глубинного культивирования использовали «дикий» штамм *P. ostreatus*, картофельно-сахарозную среду. Инкубировали в течение 14 дней в темноте при температуре 27 °С при 70 об/мин. Концентрацию белка определяли спектрофотометрически. За единицу молокосвертывающей активности принимали количество фермента, сворачивающее 100 мл молока за 40 мин при 35 °С. Общую протеолитическую активность определяли по лизису желатина в тонком слое агарового геля. Для первичной очистки применялся метод высаливания с использованием хлорида натрия. Для удаления соли применялся метод диализа. Для концентрирования препарата применяли лиофильную сушку. Катионообменную хроматографию проводили с на колонке (1,5 X 3) КМ-сефарозой (Bio-Rad, США). Анионообменную хроматографию проводили на колонке (1,5 X 3) с DEAE-сефарозой (Bio-Rad, США).

Нами был проведен первый этап очистки ферментов. Для высаливания энзимов культуральной жидкости *P. ostreatus*, использовались две соли: сульфат аммония и хлорид натрия. Ранее, по литературным данным, производилось высаливание этими солями ферментов из экстрактов плодовых тел и мицелия. В наших экспериментах использование сульфата аммония не привело к желаемому результату. В связи с тем, что методика высаливания ферментов из культуральной жидкости *P. ostreatus* отсутствует, нами были подобраны оптимальные условия. Наилучший результат дало полное насыщение раствора хлоридом натрия, температура 4 °С, pH 4,7, перемешивание 60 об/мин и 12 ч. Осаждение хлоридом натрия в нашем случае имеет еще одно явное преимущество при дальнейшем использовании ферментного препарата в пищевой промышленности: данная соль является удобным и нетоксичным реагентом. После высаливания был проведен диализ. Условия диализа также были установлены экспериментально: температура 4 °С, перемешивание 60 об/мин и 20 ч. Также для этих этапов очистки был подобран оптимальным буферный раствор: 0,1 М ацетатный pH 4,7, в котором сохраняется активность ферментов.

Таблица 1 – Начальные этапы очистки молокосвертывающих ферментов *P. Ostreatus*

Фракция	Объем, мл	Белок мг/мл	МСА во фракции, ед/мл	Общая МСА	Удельная МСА	Степень очистки
Культуральная жидкость	200	0,185	5	1000	27	1
Осаждение хлоридом натрия	50	0,22	5	250	22,7	0,84
Раствор лиофильного порошка	5	1,07	33	165	30,8	1,14

Как видно из таблицы 1, первый этап очистки культуральной жидкости позволил сохранить практически всю исходную молокосвертывающую активность.

Часть лиофильного порошка использовали для дальнейшей очистки препарата, содержащего МСА и ПА на ионообменниках (КМ– и ДЭАЭ–сефароза).

Хроматография на КМ–сефарозе показала, что протеолитическая активность исходного препарата представлена тремя фракциями:

1. Ферменты, которые элюируются с колонки буфером без добавления соли. Ферменты данной фракции обладают как общей протеолитической, так и молокосвертывающей активностью.

2. Ферменты, которые элюируются с колонки буфером, содержащим от 0,1 до 0,25 М NaCl. Ферменты данной фракции обладают общей протеолитической активностью, однако молокосвертывающей не обладают.

3. Ферменты, которые элюируются с колонки буфером, содержащим от 0,1 до 0,75 М NaCl. Ферменты данной фракции обладают общей протеолитической активностью, однако молокосвертывающей не обладают.

Таким образом, произошло частичное разделение молокосвертывающей и общей протеолитической активности препарата.

Данный метод можно рекомендовать для дальнейших более детальных исследований свойств протеолитических ферментов, входящих в исходный препарат, например, субстратной специфичности.

При хроматографии на ДЭАЭ–сефарозе фермент, обладающий молокосвертывающей активностью, не связывается с носителем, при этом достигается его очистка в 22,7 раза. Как видно из таблицы 2, при данном виде хроматографии МСА и общая протеолитическая активность не разделяются.

Таблица 2 – очистка ферментного препарата на ДЭАЭ–сефарозе

Фракция	Объем, мл	Белок мг/мл	Активность во фракции, ед/мл	Общая активность	Удельная активность	Степень очистки
Р–р лиофильного порошка	5	1,07	33	165	30,8	1
МСА:объединенная фракция	8	0,13	92,5	740	698	22,7
ПА: объединенная фракция	8	0,13	24,31	194,5	183,5	5,2

Хроматографическое разделение МСА и ПА на КМ–сефарозе можно рекомендовать для дальнейших более детальных исследований протеолитических ферментов, входящих в исходный препарат. Очистку ферментного препарата, обладающего МСА, с помощью хроматографии на ДЭАЭ–сефарозе предлагаем использовать в сыроделии на этапе образования сыр-

ного сгустка. Планируется дальнейшая очистка препарата, обладающего МСА и изучение субстратной специфичности ферментов, входящих во фракции, разделяемые хроматографией на ионообменных носителях.

### **Список использованных источников**

1. Emmanuel, V. Caseinolytic and milk-clotting activities from *Moringaoleifera* flowers / V. Emmanuel, E. PontualBelany, E. CarvalhoRanilson, S. Ranilson, C. BezerraLuana, B.B. Coelho, M.G.Paiva// Food Chemistry. – 2012. – Vol. 135. – No. 6. – P. 1848–1854.
2. Лебедева, Г.В. Выделение и характеристика фермента сычужного действия из плодовых тел вешенки обыкновенной / Г.В. Лебедева, М.Т. Проскуряков, М.А. Кожухова // Пищевая химия, 2008 – 114 с.
3. Salehi, M. Purification and characterization of a milk-clotting aspartic protease from *Withaniacoagulans* fruit / Mahmoud Salehi, Mahmoud RezaAghamaali, Reza H.Sajedi, S. MohsenAsghari, EisaJorjani// International Journal of Biological Macromolecules. – 2017. – Vol. 98. – P. 847–854.